

Калигин М. С.<sup>1</sup>, Плюшкина А. С.<sup>1,2</sup>, Титова А. А.<sup>1</sup>,  
Титова М. А.<sup>1</sup>, Андреева Д. И.<sup>1</sup>, Гумерова А. А.<sup>1</sup>, Киясов А. П.<sup>1,2</sup>

## ИЗМЕНЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ С-KIT-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

<sup>1</sup>Кафедра морфологии и общей патологии (заведующий – проф. А. П. Киясов)

Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань

<sup>2</sup>Кафедра нормальной анатомии (заведующая – доц. О. Н. Еремеева)

Казанского государственного медицинского университета,

Казань, e-mail: mfkaligin@mail.ru

**Введение.** Сахарный диабет I типа – хроническое аутоиммунное заболевание, причиной которого является недостаток β-клеток островков Лангерганса. В последнее время заболеваемость сахарным диабетом неумолимо растёт [4]. При этом диабет имеет большую социальную и экономическую значимость. Он приводит к ранней инвалидизации работоспособной части населения [4]. На сегодняшний день одним из основных методов лечения сахарного диабета I типа является симптоматическая терапия, то есть постоянное введение в организм экзогенного инсулина или инсулиноподобных препаратов. Однако это не даёт гарантии отсутствия у пациентов осложнений диабета, ведущих к инвалидизации.

Самым многообещающим решением проблемы сахарного диабета может стать применение клеточных технологий с использованием стволовых клеток. Их применение позволит лечить диабет этиологически, то есть восстанавливать популяцию β-клеток островков Лангерганса. Одна из основных проблем, затрудняющих применение стволовых клеток, заключается в сложности их идентификации и выделения из-за отсутствия чётких сведений о фенотипе этих клеток. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных маркёров клеток-предшественниц эндокриноцитов поджелудочной железы (ПЖ) является рецептор фактора стволовых клеток C-kit, или CD117. Ранее нами была показана его важная роль в пренатальном развитии островков поджелудочной железы человека [1]. Однако до сих пор неизвестно, сохраняются ли C-kit-позитивные клетки в ПЖ взрослого человека. Также отсутствуют данные о значении C-kit-позитивных клеток при сахарном диабете.

Регенерация β-клеток и островков ПЖ изучается у животных на различных экспериментальных моделях [2]. Наиболее близкой по патогенезу развития гипергликемии является модель диабета, вызванного введением аллоксана, который повреждает β-клетки островков ПЖ [3]. В связи с этим целью исследования стало изучение популяции C-kit-позитивных клеток ПЖ у человека в онтогенезе и у крысы при экспериментальном аллоксановом диабете.

**Материалы и методы.** Аутопсии ПЖ взрослого человека в возрасте от 45 до 70 лет были получены в патологоанатомических отделениях ЛПУ г. Казани при информированном согласии родственников.

Исследование проведено на 33 белых беспородных крысах самцах, которые были разделены на группы. Животным 1-й группы внутривенно вводи-

ли аллоксан (Sigma-Aldrich) в 1 мл 0,02 М ацетатного буфера  $\text{pH} = 4,0$  в дозе 180 мг/кг, животным 2-й группы вводили ацетатный буфер (контроль действия растворителя). Животным 3-й группы ничего не вводили (норма). Через 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 суток у животных забирали кровь для биохимического исследования, животных выводили из эксперимента и забирали ПЖ для морфологического анализа.

Ткани ПЖ заливали в парафин по стандартной методике.

Парафиновые срезы ПЖ окрашивали иммуногистохимически с коммерческими антителами против С-kit — маркера клеток-предшественниц, инсулина — маркера дифференцированных  $\beta$ -клеток и глюкагона — маркера дифференцированных  $\alpha$ -клеток. Уровень глюкозы определяли в сыворотке крови глюкозооксидазным методом [5], уровень инсулина и глюкагона определяли методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** В тканях ПЖ здорового взрослого человека мы наблюдали редкие одиночные С-kit-позитивные клетки, которые присутствовали только в образцах ПЖ пациентов не старше 50 лет. При проведении двойного окрашивания С-kit-позитивных клеток, синтезирующих инсулин, мы не наблюдали.

В крови крыс второй и третьей группы уровни глюкозы, инсулина и глюкагона сохранялись в пределах нормы. В ткани ПЖ морфологических изменений в этих группах не выявлено.

Через сутки после введения аллоксана в крови крыс наблюдали повышение уровня глюкозы, что свидетельствовало о развитии гипергликемии. Уже на этом сроке в одиночных клетках островков ПЖ крыс мы выявили экспрессию С-kit, и она сохранялась в этих клетках на всех исследованных сроках. В других клетках ПЖ экспрессии С-kit мы не наблюдали.

При изучении экспрессии инсулина через двое суток эксперимента было обнаружено явное уменьшение количества инсулин+ клеток по сравнению с нормой — они становились единичными. К 5–7-м суткам число инсулин+ клеток приближалось к норме. Следовательно, после однократного введения аллоксана и вызванного этим повреждения  $\beta$ -клеток ПЖ возможно восстановление синтеза этого гормона. Данный вывод подтверждался снижением уровня глюкозы в крови начиная со вторых суток эксперимента и одновременным повышением уровня инсулина в крови с этого же срока.

При исследовании экспрессии глюкагона наблюдали противоположную картину. В норме позитивное окрашивание на глюкагон в поджелудочной железе крысы наблюдается по периферии островков в одном-двух рядах клеток. На 2-х и 3-х сутках эксперимента количество глюкагон+ клеток возрастало. Глюкагон клетки располагались не только по периферии, но и занимали площадь практически всего островка. Однако после 5-го дня в островках ПЖ крыс количество глюкагон+ клеток уменьшалось, они вновь располагались лишь по периферии. Такая морфологическая картина коррелировала с показателями уровня глюкозы и глюкагона в крови: на 2-е сутки эксперимента уровни глюкагона и глюкозы в крови повышаются, а после 3-х суток — снижаются.

Интересно, что при сопоставлении результатов морфометрических исследований серийных срезов, окрашенных на инсулин и глюкагон, оказалось, что

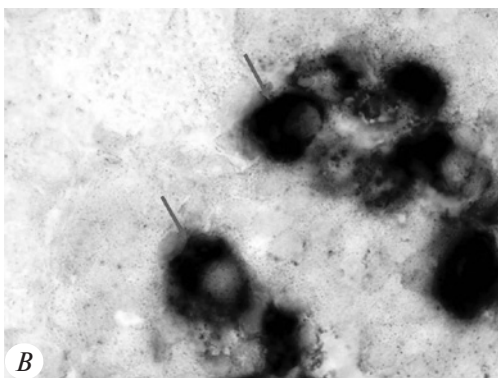
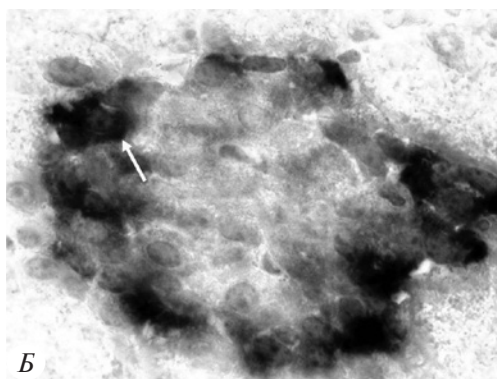
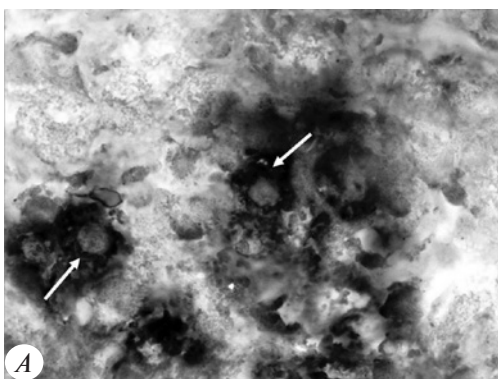
в островках некоторых образцов сумма площадей инсулин+ и глюкагон+ частей островка была более 100 процентов. Такие показатели могут быть связаны с тем, что при экспериментальном диабете в островках появляются клетки, одновременно синтезирующие оба гормона — инсулин и глюкагон и области окрашивания перекрываются. Это предположение было подтверждено при двойном окрашивании на инсулин и глюкагон (рис. А).

При окрашивании серийных срезов на глюкагон, и С-kit мы обнаружили, что С-kit+ островки и глюкагон+ островки имели сходную форму и одинаковую локализацию. При проведении двойного окрашивания на С-kit и глюкагон мы обнаружили С-kit+/глюкагон+ клетки (рис. Б). При анализе серийных срезов, окрашенных на С-kit и инсулин, подобной закономерности выявлено не было. Однако проведение двойного окрашивания на инсулин и С-kit позволило обнаружить единичные С-kit+/инсулин+ клетки (рис. В).

Таким образом, С-kit+ клетки островков ПЖ сохраняются у здорового взрослого человека, а при экспериментальном аллоксановом диабете могут участвовать в коррекции морфологических изменений в островках и уровня глюкозы в крови крысы путём дифференцировки в β-клетки через стадию глюкагон-продуцирующих клеток.

**Обсуждение.** На основании полученных результатов мы предполагаем, что восстановление популяции β-клеток происходит следующим образом. После повреждения β-клеток в крови повышается уровень глюкозы, что является стимулом для активации стволового компартмента островков. На мембране клеток-предшественниц островков появляется С-kit, который связывается со своим лигандом — фактором стволовых клеток, и запускает процесс дифференцировки С-kit+ клеток. При этом процесс дифференцировки происходит через стадию С-kit+/глюкагон+ клеток. Далее С-kit+ клетки начинают синтезировать глюкагон и инсулин, и постепенно эти клетки становятся только инсулин-продуцирующими. Самое интересное, что эта последовательность дифференцировки С-kit+ клеток очень напоминает пренатальное развитие эндокриноцитов поджелудочной железы человека, когда С-kit+ клетки протоков ПЖ сначала, с 8,5-й недели гестации, начинают синтезировать глюкагон, а затем в этих же клетках появляется инсулин. При этом в островках также имеются С-kit+ клетки, одновременно синтезирующие глюкагон и инсулин [1]. Таким образом, результаты нашего исследования опровергают данные о том, что развитие популяций β- и α-клеток происходит независимо друг от друга [6]. Наоборот, они подтверждают существование одной общей клетки-предшественницы для β- и α-клеток островков ПЖ [7]. По мере дифференцировки эндокринных клеток количество С-kit на мембране уменьшается, и образуются дифференцированные эндокриноциты.

Обнаружение одной клетки-предшественницы для β- и α-клеток ПЖ, которая сначала синтезирует глюкагон, а затем и инсулин, требует дальнейшего изучения и пересмотра патофизиологических основ развития сахарного диабета I типа. Данный факт позволяет предположить, что при сахарном диабете I типа гипергликемия является следствием не только недостатка инсулина, но и избытка глюкагона. То есть клетки-предшественницы начинают дифференцироваться,



Клетки островка ПЖ крысы при ЭД: А – клетки, одновременно экспрессирующие инсулин и глюкагон, стрелки; Б – клетки, одновременно экспрессирующие C-kit и глюкагон, стрелка; В – клетки, одновременно экспрессирующие C-kit и инсулин, стрелки. Ув. 1000х

чтобы восполнить недостаток инсулина. Однако при этом они сначала начинают синтезировать глюкагон, который еще более усугубляет ситуацию. То что C-kit+ клетки способны дифференцироваться в  $\alpha$ - и  $\beta$ -клетки ПЖ, позволяет утверждать, что именно этот маркер действительно характерен для клеток-предшественниц эндокриноцитов, что открывает перспективы для разработки новых методов лечения сахарного диабета I типа путём трансплантации C-kit+ клеток ПЖ, которые будут синтезировать гормоны и корректировать нарушения углеводного обмена. Кроме того, поскольку C-kit – это трансмембранный рецептор, то он является наиболее привлекательным и перспективным маркером с точки зрения выделения этих клеток для последующего культивирования и трансплантации. А поскольку C-kit-позитивные клетки сохраняются в ПЖ как минимум до 50 лет, то их донором может стать не только ребёнок, но и взрослый человек.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Калигин М. С., Гумерова А. А., Титова М. А., Андреева Д. И., Шарипова Э. И., Киясов А. П. C-kit маркер стволовых клеток эндокриноцитов поджелудочной железы // Морфология. 2011. Т. 140 (4). С. 32–37.
2. Закирьянов А. Р., Онищенко Н. А. Возможные пути реализации регенерационной стратегии при лечении сахарного диабета I типа методами клеточной трансплантации // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. 2(II). С. 23–33.

3. Баранов В. Г., Соколоверова И. М., Гаспарян Э. Г. Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. Л.: Наука, 1983.
4. Дедов И. И., Мельниченко Г. А., Фадеев В. Ф. Эндокринология. М.: ГЭОТАР – Медиа, 2007.
5. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии. М.: Наука, 1977.
6. Herrera P. L., Huarte J., Zufferey R. et al. Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 12999–13003.
7. Jensen J., Heller R. S., Funder-Nielsen T. et al. Independent development of pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells from neurogenin3-expressing precursors a role for the notch pathway in repression of premature differentiation // J. Diabetes. 2000. Vol. 49. P. 163–176.

*Комарова А. С.*

## **К ВОПРОСУ О НЕМИОГЕННЫХ ИСТОЧНИКАХ РАЗВИТИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ**

*Кафедра гистологии с курсом эмбриологии (заведующая – проф. И. А. Одинцова)*

*Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова,*

*Санкт-Петербург, e-mail: comi27@rambler.ru*

---

В последнее время все чаще появляются публикации о существовании немиогенных источников развития миобластов и миосателлитоцитов скелетной мышечной ткани [2, 3, 7]. Авторы описывают появление клеток этой разновидности мышечной ткани из материала несомитных эмбриональных зачатков [4, 5, 10]. Ряд исследователей указывает на возможность развития миосателлитоцитов из гемопоэтических клеток красного костного мозга [8, 9]. Чаще всего в качестве альтернативных немиогенных источников миосателлитоцитов указывают мезоангиобласты (эмбриональные клетки, ассоциированные с кровеносными сосудами), SP (side population) – клетки, AC133+клетки (циркулируют в крови) и MDSC (клетки, обнаруженные «в составе мышцы», тканевая принадлежность не выяснена). Имеются единичные сведения о «наличии миогенных свойств» у миеломоноцитарных клеток-предшественниц [6]. Обзор научных статей по данному вопросу показал, что отсутствует единый принцип трактовки данных, полученных разными исследовательскими группами, имеются факты смешения различных иерархических уровней организации биологических систем и терминологические расхождения. Во избежание таких неувязок было бы целесообразно проводить анализ экспериментального материала о стволовых и камбиальных клетках скелетной мышечной ткани с фундаментальных теоретических позиций, разработанных отечественными учеными-гистологами – А. А. Заварзиным, Н. Г. Хлопиным, С. И. Щелкуновым, А. А. Клишовым, Р. К. Даниловым и их учениками. Понятия о клеточно-дифференционной организации тканей, основных закономерностях гистогенеза